

## 非小分子蛋白降解靶向嵌合体的研究进展

蒋宏香,陈爱芳,马文辉,徐道华

(广东医科大学药学院,东莞 523808)

**[摘要]** 靶向蛋白降解(targeted protein degradation, TPD)策略作为有前景的新药开发技术之一,已经被学术界和工业界用来解决传统小分子抑制剂无法有效作用的靶向蛋白。蛋白水解靶向嵌合体( proteolytic targeting chimera, PROTAC)已逐渐成为 TPD 领域研究最为成熟的蛋白质靶向降解技术,其由一个靶蛋白( protein of interest, POI)配体、一个 E3 连接酶配体以及连接 2 个配体的连接子构成。POI 配体与受体蛋白结合后,PROTAC 就会招募 E3 连接酶对该蛋白进行泛素化,最后通过泛素-蛋白酶体系统将其降解。PROTAC 可以针对缺乏明显活性位点的蛋白质进行降解,这些蛋白质往往参与癌症和其他类型疾病的发展,因此 PROTAC 技术在临床应用方面具有很大潜力。为了更好地实现 PROTAC 的靶向传递和组织选择性,业界已经开始探索更多的策略,如通过寻找新的 E3 连接酶和开发相应的配体,研究更多新兴的 PROTAC 模式进一步促进 PROTAC 的发展,本文将对这些技术以及相关研究进行讨论。

**[关键词]** 靶向蛋白降解;泛素-蛋白酶体系统;蛋白水解靶向嵌合体;药物靶点;癌症治疗

**[中图分类号]** R914.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)20-2080-07

## Progress in research of non-small molecule protein degradation targeting chimeras

JIANG Hong-xiang, CHEN Ai-fang, MA Wen-hui, XU Dao-hua

(School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** Targeted protein degradation (TPD) strategies have been used by academia and industry as one of the promising new drug development technologies to address targeted proteins that are not effectively acted upon by conventional small molecule inhibitors. Protein hydrolysis-targeted chimeras (PROTAC) have become the most well-studied protein-targeted degradation technique in TPD, which comprises of a POI-binding ligand, an E3 ligand, and a linker connecting the two ligands. Once the POI ligand binds to the receptor protein, PROTAC recruits the E3 ligand to ubiquitinate the protein and finally degrades it through the ubiquitin-proteasome system. PROTAC technology offers great potential for therapeutic applications because it can target proteins that lack well-defined active degradation sites, which are often involved in the pathogenesis of cancer and other diseases. To enhance PROTAC's target delivery and tissue selectivity, the industry has begun to investigate new strategies, such as discovering new E3 ligases and developing corresponding ligands, along with continuing to investigate more emerging PROTAC modalities to further promote PROTAC. These strategies and relevant studies are discussed in this review.

**[Key words]** targeted protein degradation; ubiquitin-proteasome system; proteolytic targeting chimera; drug target; cancer therapy

**[基金项目]** 广东省普通高校重点项目(2019KZDXM056)

**[作者简介]** 蒋宏香,女,硕士研究生,研究方向:抗肿瘤新药的研发。E-mail:hxjiang0803@163.com。

**[通讯作者]** 徐道华,男,教授,硕士生导师,研究方向:抗肿瘤药物研究。联系电话:(0769)22896551,E-mail:daohuax108@163.com。

靶向蛋白降解 (targeted protein degradation, TPD) 能够特异性地识别靶蛋白 (protein of interest, POI), 利用细胞内固有的两大蛋白质降解系统: 泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 和自噬-溶酶体途径直接高效精准地降解靶蛋白, 这提供了一种新的靶向治疗方法。目前大多数药物都为小分子抑制剂, 它们通过与致病蛋白特异性结合, 阻断其生物功能。而这些能被抑制剂结合的蛋白如蛋白激酶、离子通道、G 蛋白偶联受体仅占人类蛋白质组的 20%, 而剩余的蛋白质由于缺乏明确的功能结合位点 [如支架蛋白或通过蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 发挥功能的蛋白], 往往被认为是不可成药的靶点<sup>[1]</sup>。尽管如此, 这些靶点中有许多在癌症和其他疾病中起着关键作用, 因此开发能够针对这些靶点的技术对学术界来说极具吸引力。

蛋白质的降解在维持细胞正常生理活动方面发挥着极其重要的作用, 蛋白降解系统紊乱可引起肿瘤及部分神经退化性疾病等疾病的发生。而随着对蛋白酶体和溶酶体这 2 种降解系统研究的不断深入, TPD 领域已发展出了蛋白水解靶向嵌合体 (proteolytic targeting chimera, PROTAC)、分子胶、降解标签、溶酶体靶向嵌合体等降解技术。UPS 是降解细胞内蛋白质的主要途径, 其机制是在泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 以及泛素连接酶 E3 的级联催化下, 靶蛋白被标记多泛素化, 最后由 26S 蛋白酶体识别并降解<sup>[2]</sup>。PROTAC 便是基于这一途径被开发出

来, 该项技术在 TPD 领域已为人所熟知且有大量出色的研究结果, 本文将对 PROTAC 针对的靶点以及不同类型的非小分子 PROTAC 进行介绍。

## 1 PROTAC 的降解机制

PROTAC 是一种异双功能分子, 主要由两端的靶蛋白结合配体与 E3 连接酶结合配体构成, 2 个配体中间通过一条连接器共价连接, 这特殊的结构可以使 PROTAC 分子与 POI 和 E3 连接酶形成稳定的三元复合物, 当 E3 连接酶诱导 POI 泛素化的同时 PROTAC 分子脱离, 开始新一轮的降解循环<sup>[3]</sup> (见图 1), 这种降解模式被称为“事件驱动”。与传统小分子药物通过占据驱动药理学作为作用模式不同, 事件驱动作用模式不要求 PROTAC 与 POI 之间有高度的亲和力, 也不需要高剂量的药物浓度来保持高的靶点占用率。这不仅使 PROTAC 可以靶向缺乏酶活性的靶标, 同时避免了由于高药物浓度诱导非目标蛋白结合而引起的不良反应。需要注意的是, 仅需催化量的 PROTAC 就可以很好地发挥降解活性。这种亚化学计量相较于催化机制赋予了 PROTAC 较好的药效学性能, 然而在 POI 被高浓度的 PROTAC 降解耗尽, 而其重新合成的速度又较慢的情况下, PROTAC 有可能在体内出现长时间的暴露, 为了减少与药物暴露相关的毒性, 对于 PROTAC 的浓度需要精确的模式控制。此外, PROTAC 分子对靶蛋白的降解效率与浓度具有相关性, 过高浓度的 PROTAC 分子可能会与 POI 或 E3 连接酶单独形成二元复合物, 使靶蛋白的降解效率变低<sup>[4]</sup>。

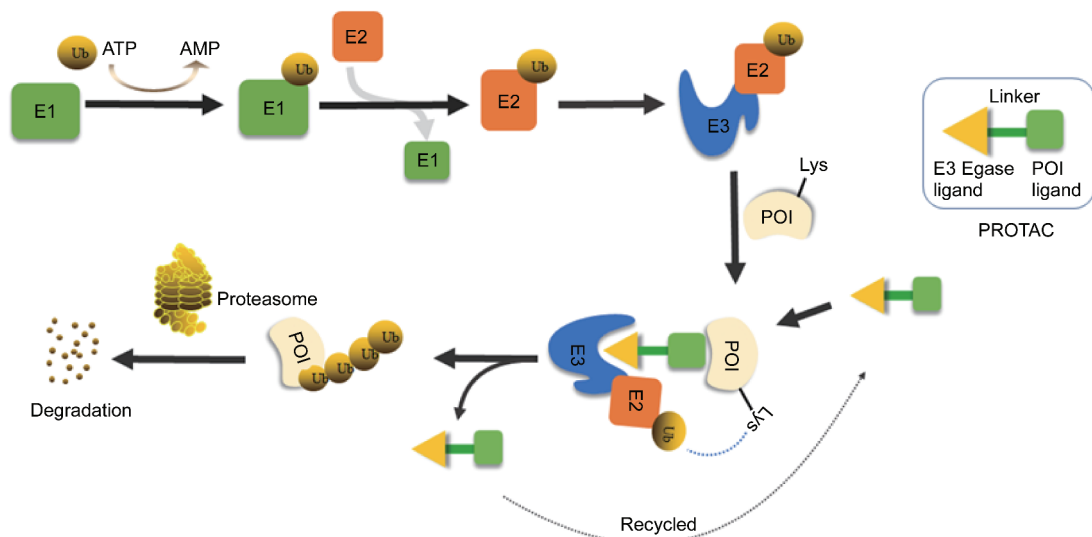


图 1 PROTAC 的组成及作用机制

## 2 可供靶向的蛋白

最初开发的 PROTAC 技术以多肽为配体招募 E3 连接酶靶向目标蛋白后进行降解,后续为了提高 PROTAC 分子的成药性,更多的研究重点集中在开发小分子 PROTAC 上,而这就需要寻找更多可用于小分子靶向结合的蛋白,经过 20 多年的研究,为了更好地促进 PROTAC 的合理设计,众多关于 PROTAC 信息和相关实验的数据库陆续建立,此前已有来自 Dana-Farber 癌症研究所的研究团队利用化学蛋白质组学为 200 种激酶建立了数据集<sup>[5]</sup>。之后,汇编了 PROTAC 结构信息的开放式数据库也被开发出来,该数据库汇集了研究发现的多种 PROTAC 及其弹头、连接子、E3 配体,并对其化学结构、生物活性和物理化学性质做了详细注释<sup>[6]</sup>。近期,该数据库更新了 2.0 版本,新版本的 PROTAC 数量相比第 1 个版本扩展了 96%。随着更多不同 PROTAC 的出现,可用于 PROTAC 技术的靶蛋白已达到上百种,其中包括核受体蛋白、激酶蛋白、转录调控蛋白还有与特定疾病相关的蛋白,如神经退行性相关蛋白等其他种类的蛋白。

**2.1 核受体蛋白** 核受体蛋白是最早被发现用于 PROTAC 靶向降解的蛋白。2003 年 Sakamoto 等<sup>[7]</sup>尝试通过显微注射 PROTAC 到完整细胞内,对其降解活性进行细胞水平的验证,结果发现雄激素受体 (androgen receptor, AR) 与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 能被 PROTAC 分子有效地诱导降解,从而验证了 AR 与 ER 是可靶向的目标蛋白。这 2 种受体也成为后续进入临床试验的 PROTAC 的主要靶标,Arvinas 公司在 2019 年推动首款 PROTAC 药物 ARV-110 进入临床试验研究,这是一款选择性靶向 AR 的 PROTAC 小分子药物,用于治疗转移性去势耐药前列腺癌,2020 年美国临床肿瘤学会公布了有关 ARV-110 的 I 期临床研究数据,提供了 ARV-110 介导的 AR 降解的初步证据,且数据显示 ARV-110 耐受性良好,尽管有轻度恶心和腹泻的不良反应,但总的来说 I 期临床研究的安全数据能够支持进一步的剂量升级。在 ARV-110 进入临床试验不久,紧接着,Arvinas 公司研发的针对局部晚期或转移性 ER+/HER2 阴性乳腺癌的 ARV-471 也进入了临床研究。同样的,ARV-471 的临床试验结果显示其可显著降低肿瘤患者组织中的 ER 表达水平,未发现严重不良反应的发生,临床受益率达到 38%。在临床试验数据公布一段时间后,Arvinas 公司便与

辉瑞公司宣布将共同开发和商业化 ARV-471。目前该 2 种药物均处于 II 期临床试验研究当中。

**2.2 激酶蛋白布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK)** 目前全球范围内共批准 5 款 BTK 抑制剂上市,其中伊布替尼属于第 1 代 BTK 抑制剂,但其存在一定的脱靶效应,并可诱发许多严重的不良反应<sup>[8]</sup>。这是由于 C481S (481 位的半胱氨酸到丝氨酸突变) BTK 突变造成的。由于伊布替尼不能与丝氨酸的羟基形成共价键,而且在 BTK 周转率较高的快速生长肿瘤中,共价抑制剂可能无法对靶点产生完全抑制。PROTAC 与传统小分子抑制剂不同的是其不直接抑制靶蛋白的活性,而是直接降解具有异常功能的蛋白质。因此,可以通过使用 PROTAC 分子来解决由 C481S BTK 突变引起的耐药性问题。另外,PROTAC 的配体通过与靶蛋白共价结合的方式可以带来强大的靶标结合力和占有率,还可改善 PROTAC 的膜渗透性。而在进行可逆与不可逆共价 PROTAC 及非共价 PROTAC 的降解活性对比研究时,常将 BTK 作为其选择的靶点。

**2.3 溴结构域包含蛋白 (bromodomain-containing proteins, BRDs) 蛋白** BRDs 蛋白家族包含 8 个亚家族,其中溴结构域和超末端结构域 (bromodomain and extraterminal domain, BET) 是目前研究最多的一类,主要包括 BRD2, BRD3, BRD4 以及 BRDT,其中 BRD4 的表达失调与多种癌症和炎症性疾病的形成密切相关<sup>[9]</sup>。由于 BET 家族的成员都具有相似的结合位点,因此 BRDs 抑制剂也存在一些选择特异性的问题,而 PROTAC 作为一种新的治疗策略可以有效地提高靶标选择性。一些针对 BRDs 的 PROTAC 已经被开发出来,研究表明可将叶酸基团与 von Hippel-Lindau (VHL) 的配体以共轭方式结合,从而得到 folate-ARV-771,为一种能够实现选择性递送的笼状 PROTAC,使其能够在肿瘤细胞中以叶酸受体依赖的方式选择性降解 BRDs。但叶酸基团的结合使得 PROTAC 的相对分子量增大,这可能会影响叶酸-PROTAC 的口服生物利用度和药动学<sup>[10]</sup>。另外,运用适体-PROTAC 偶联的新策略可进一步提高 PROTAC 的靶向选择性。通过可切割的连接子将 BET 靶向的 PROTAC 与核酸适配子 AS1411 偶联结合的适体-PROTAC 偶联物,与未修饰的 BET PROTAC 相比,该结合物对乳腺癌细胞显示出更好的靶向性和更强的 BET 降解作用。

### 3 非小分子的 PROTAC

**3.1 多肽 PROTAC** 靶蛋白表面的活性部位通常比较平坦,缺乏深的结合口袋,与小分子对接具有一定难度。多肽 PROTAC 可与潜在配体之间产生 PPI,避免了浅结合口袋的局限性,具有更高的选择性和亲和力。与小分子 PROTAC 不同,多肽 PROTAC 在体内的毒性相对较低,在设计和合成方面相对而言也比较简单,甚至具有更高的特异性,但其膜通透性和稳定性较差。

多肽 PROTAC 作为第 1 代 PROTAC,最早出现在研究人员视野中是由于 Sakamoto 等<sup>[11]</sup>在 2001 年开发出了一种嵌合化合物——PROTAC-1,研究将 I kappa B $\alpha$  磷酸肽作为连接酶配体来招募 E3 连接酶 SCF $\beta$ -TRCP,并用卵圆蛋白作为 POI 配体,在胞外诱导 MetAP-2 的降解。2003 年,Sakamoto 等<sup>[7]</sup>尝试将 PROTAC 技术靶向 AR 和 ER,这 2 种蛋白分别与乳腺癌和前列腺癌的进展有关,这也是首次关于 PROTAC 在细胞内可有效性降解的报道。2004 年,Schneekloth 等<sup>[12]</sup>提出了首个具有细胞穿透性且能在体内应用的多肽 PROTAC,该团队应用低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 中的多肽 ALAPYIP 作为 E3 泛素连接酶的配体,此配体可招募一种 E3 泛素连接酶——VHL,这是 VHL 首次被发现能够被招募到 PROTAC 分子中。

目前各种具有稳定性和膜通透性的多肽抑制剂在多种疾病领域都已成功应用。近年来有研究在轴蛋白衍生多肽基序的基础上设计了 2 种不同的装订螺旋多肽,再通过化学连接物将这 2 种多肽与 VHL 配体结合,从而设计出一种可降解  $\beta$ -连环蛋白新型的 PROTAC。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号的过度激活可引起多种疾病,该多肽 PROTAC 可降解介导通路的  $\beta$ -连环蛋白从而阻断 Wnt 信号,有效抑制结直肠癌患者衍生类器官的存活<sup>[13]</sup>。

**3.2 核酸 PROTAC** 基因疗法具有很高的特异性,可用于治疗不同种类的疾病,包括癌症、病毒感染、遗传性疾病等。对于缺乏可行配体结合口袋的蛋白质,可在传统的基因疗法上引入嵌合结构,设计基于核酸作为弹头的 PROTAC 对其进行降解。目前 RNA 结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)、转录因子(transcription factors, TFs)、适体以及 G-四联体(G-quadruplex, G4)结合蛋白都可用 PROTAC 技术进行降解。

RBPs 负责调控基因转录和 RNA 的替代剪接。

其通过各种 RNA 结合位点与 RNA 分子相互作用,因此 RNA 结合位点可作为一个药物作用靶点,目前研究大都采用与 RNA 共有序列的短寡核苷酸作为 RBPs 的弹头,随即将其对接到 E3 连接酶募集部分。首个 RNA PROTACs 已对 Lin28 与 RBFOX1 这 2 种 RBPs 蛋白的降解进行了概念验证,并证明了其在癌症细胞系中的应用<sup>[14]</sup>。

TFs 通常通过与特定 DNA 序列结合和 PPI 来调节功能,因此将 DNA 特异序列连接到 E3 连接酶募集部分可开发出相应的 PROTAC,从而模仿 TFs 的内源性配体实现靶向降解。最初,转录因子靶向嵌合体(transcription factor targeting chimeras, TRAFACs)由一个转录因子结合的双链 DNA 与一个 HaloTag 融合的 dCas9 蛋白共价连接的嵌合寡核苷酸组成,该嵌合寡核苷酸通过中间蛋白招募 E3 连接酶,诱导与致癌相关的转录因子——调控核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和 brachyury 的降解<sup>[15]</sup>。紧接着,OlivoTRAFACs 作为第 2 代 TRAFACs 被成功开发出来,其可以有效降解 2 种致癌转录因子:C-cyc 和 brachyury<sup>[16]</sup>。此外,OlivoTRAFACs 不需要进行额外的基因改造便可在体内表现出卓越的降解活性。

适体具有独特的三维构象,结构便于修饰,容易筛选,适合大规模制备,且没有明显的免疫原性。重要的是,适配子作为单链的核酸分子,其可通过氢键、范德华力、碱基堆积力和静电效应与靶标结合,具有高亲和力和特异性<sup>[17]</sup>。运用适体-PROTAC 偶联方法可改善传统 PROTAC 膜渗透性欠佳及细胞毒性等问题,首个适体-PROTAC 偶联物针对靶向 BET 的 PROTAC 进行修饰,通过连接子将后者与核酸适配子 AS1411 偶联,降解效率明显提高,在肿瘤模型中也显示出比原先更好的靶向性和低毒性<sup>[18]</sup>。

G4 是由多个鸟嘌呤碱基堆积而成的特殊四链核酸结构,其形成涉及基因复制、转录等细胞过程,其形成失调是部分疾病的致病原因。RHAU 解旋酶是一种典型的 G4 结合蛋白,在 C9orf72 基因连锁的肌萎缩侧索硬化症患者的组织中有着高表达。G4-PROTAC 通过将含有 G4 基序的弹头分别与 E3 连接酶 cereblon (CRBN) 和 VHL 连接,在 HeLa 和 K-562 细胞中均能显著降解 RHAU。这证明除了简单序列基序之外,由非经典核酸结构介导的靶向蛋白质降解也具有一定的可行性<sup>[19]</sup>。

**3.3 抗体 PROTAC** 抗体-PROTAC 要求嵌合

降解剂的有效载荷在溶酶体环境中具有良好的稳定性和有效逃离溶酶体隔室的能力。此外,抗体-PROTAC 还应在其靶向的肿瘤、组织或其他对降解物靶向的生物途径的调节敏感的细胞中高度表达,而在另外的组织和细胞中低表达。

相对于传统未经修饰的 PROTAC 分子而言,抗体-PROTAC 提供了几个潜在的优势。这些可能的益处包括:① 改善传统 PROTAC 的药物代谢和药理学特性,提供新的靶向嵌合体体内递送策略。② 减少未偶联的 PROTAC 因长期全身暴露所产生的可能的毒性。③ 被选择用于抗体偶联药物识别的抗原能将感兴趣的 PROTAC 分子靶向特定肿瘤或组织,减少旁观者效应。基于这些优势,抗体-PROTAC 可在特定的细胞类型中实现组织特异性降解,且产生最小的不良反应。

开发抗体-PROTAC 中一个重要的促因是目前常用的 PROTAC 技术多数只能降解胞内蛋白,对无胞浆结合区域的膜蛋白和胞外蛋白却束手无策。人类体内超过 1/5 的编码基因都属于膜蛋白,大约有 70% 的药物都是针对膜蛋白编码基因的,如果能有效实现膜蛋白的定位,将大大扩宽 PROTAC 技术在蛋白质降解领域的应用。以程序性细胞死亡-配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 为例,作为一种跨膜蛋白,只有少数配体能与其结构域结合。2020 年,溶酶体靶向嵌合体 (lysosome-targeting chimeras, LYTAC) 技术的出现,为分泌蛋白和细胞膜外相关蛋白进行靶向降解提供了新的手段,且该技术对于 PD-L1 受体的降解效果在基础实验中得到了验证<sup>[20]</sup>。Cotton 等<sup>[21]</sup>假设一种基于双特异性 IgG 抗体的 PROTAC (antibody-based PROTACs, AbTACs) 可以通过将膜结合的 E3 连接酶招募到目的蛋白上诱导降解。研究采用 RNF43 作为 AbTACs 招募的 E3 连接酶,该连接酶包括一个结构化的胞外域和一个胞内环域,以促进噬菌体展示抗体的产生。最终验证 AbTACs 可通过招募膜结合的 E3 连接酶 RNF43,进而通过内化和溶酶体的参与,实现 PD-L1 的有效降解。

**3.4 光调控 PROTAC** 光以精确而高效的时空分辨率在控制生物系统领域而闻名,其具有非侵入性和可逆性,并可远程调节细胞功能。许多生物研究领域开始使用光调控生物网络,如光遗传学已尝试从基因水平引入光传感器来控制神经元活动。目前

光遗传学所依赖的发色团基本来自生物体内(如视网膜或黄素),与此不同的是,光药学的发色团则是完全合成的结果,需要在外部提供<sup>[22]</sup>。这些人工合成的发色团通过共价或非共价的形式与修饰过的受体结合,形成一个复合型分子,然后通过各种有效手段改变其药动学和药效学特征影响细胞的生物活性。对小分子进行光改造主要有 2 个策略:光笼(或笼化)和可逆的光开关。通过这 2 种策略都可实现 PROTAC 的光激活,其中,光笼 PROTAC 的设计战略是使用一种保护基团来掩盖药效基团,当没有光照情况下,PROTAC 处于静默状态;当用特定波长光照射时,保护基团便被切割从而释放活性的 PROTAC。相比光笼策略不可逆的释放活性物质而言,光开关 PROTAC 蛋白质降解的可逆激活和失活提供了更好的优势。Reynders 等<sup>[23]</sup>将光开关与 PROTAC 技术结合,将 E3 泛素连接酶配体作为光开关结合的靶点,使用偶氮苯连接基取代传统线性聚醚结构的连接子,从而设计出一种具有偶氮苯光开关的光化学靶向嵌合体 (photochemically targeting chimeras, PHOTAC),其可针对 BET 蛋白 (BRD2, BRD3, BRD4) 或 FKBP12 蛋白进行可控降解。这种邻位-F4-偶氮苯连接基具有高度双稳性,且可逆控制 2 个配体间的拓扑距离,使 PHOTAC 不需要光的连续照射就能保持长久的稳定状态。此外,这一策略可能适用于治疗干预,以应对各种疾病。

**3.5 纳米 PROTAC** 纳米技术一直是科学界实行肿瘤特异性的常用手段,将纳米技术与 PROTAC 技术结合起来,或许可使 PROTAC 在临床上有更好的应用前景。聚合物 PROTAC (POLY-PROTAC) 纳米平台可将 POLY-PROTAC 组装成胶束纳米颗粒从而达到全身性的传递<sup>[24]</sup>。此外,一种二苯环辛烷负载的预靶向纳米颗粒 (nanoparticle, NP) 可使小分子 PROTAC 的血液循环延长,增强 PROTAC NPs 的肿瘤内积累和保留,因此可与化疗或免疫治疗联合,来扩大 PROTAC 的癌症治疗领域。近来还有研究报道了一种可与光疗法结合并用于光免疫代谢癌症治疗的半导体聚合物纳米 PROTAC——SPNpro。SPNpro 可使吡啶胺 2,3-二氧酶定向分解,这种酶的持续降解可促进效应 T 细胞的激活,提高抗肿瘤 T 细胞的免疫力。使用 SPNpro 介导免疫代谢并协同光疗法治疗癌症,可有效地抑制肿瘤的生长和增殖转移<sup>[25]</sup>。

表 1 各种类型 PROTAC 的组成及优缺点

PROTAC	E3 配体	POI 配体	优点	缺点
小分子 PROTAC	小分子	小分子抑制剂	高稳定性;膜渗透性良好	对许多致病蛋白的降解具有限制性;不良反应较多
多肽 PROTAC	多肽	小分子;多肽片段	生物相容性高;低毒性;可靶向难以下药的蛋白质;合成简单	细胞通透性低;稳定性弱;潜在免疫原性
核酸 PROTAC	小分子	核酸	提高传统 PROTAC 分子的水溶性、膜通透性和肿瘤靶向性;可降解任何转录因子	不稳定;半衰期短;药理学性质欠佳;仅降解核酸结合蛋白
抗体 PROTAC	抗体	抗体	可以靶向传统 PROTAC 难以靶向的细胞表面受体	成本较高;不稳定;潜在的免疫原性
光调控 PROTAC	小分子;光控小分子	小分子;光控小分子	实现药物的精确可控释放,降低毒性与不良反应	遇光不稳定
纳米 PROTAC	小分子;半导体聚合物、癌症生物标志物可切割肽和小分子的三元复合物	小分子	实现 PROTAC 的肿瘤特异性递送,解决 PROTAC 脱靶问题	分子量高,导致口服生物利用度低

#### 4 总结和展望

20 多年来,从首个分子的概念证明到越来越多相关药物进入临床研究,PROTAC 在针对肿瘤、免疫性疾病和神经退行性疾病等其他疾病的治疗研究中都有了显著的进展<sup>[26]</sup>。多种非小分子 PROTAC 在针对 POI 的特异靶向和组织选择性方面都有着出色的能力,减少了耐药性和不必要的毒性,从而使 PROTAC 的治疗指数最大化。随着学术界与工业界众多研究与技术的不断投入,PROTAC 还有许多待开发的领域,如寻找新的 E3 连接酶及其配体,这是 PROTAC 实现组织和细胞特异性的重要挑战。

迄今为止,可被应用于 PROTAC 特异识别的 E3 连接酶尚未开发完全,寻找新的 E3 连接酶可进一步扩大靶向降解技术的可用靶点范围。原则上,E3 连接酶的结合配体不需要具有降解活性,只要其能与 E3 连接酶表面结合就能使 PROTAC 发挥作用。因此,基于先导化合物片段设计,通过蛋白质单晶衍射和核磁共振技术等方法寻找新的 E3 连接酶和新配体是个可行的策略。例如:可用差示扫描荧光法在片段库中筛选出符合标准的小分子化合物,使用药物化学方法不断的优化结构,最后通过液相色谱-质谱法、核磁共振光谱和 X 射线晶体结构分析方法验证出最佳的化合物。噬菌体展示技术常用于多肽的展示和筛选,可将这一技术应用于筛选合适的多肽配体,再利用药物化学方法开发出模拟多肽的配体以此来招募新的 E3 连接酶。噬菌体展示技术除了可以鉴定线性多肽外,还可以用于鉴定和开发

环肽和大环肽。环肽可以靶向目标蛋白表面且能与靶蛋白产生 PPI,具有形成分子内氢键的潜力,因此比线性环肽具有更大的渗透性和更高的代谢稳定性。另外,通过随机肽库如随机非标准肽集成发现系统可针对组织或器官特异的 E3 连接酶筛选出具有高结合亲和力的环肽配体。除了片段筛选的方法外,还可以通过设计新型的 DNA 编码文库(如共价 DNA 编码文库)、非共价片段文库或者通过表型筛选的方式来寻找与目标蛋白具有合适亲和力的新型分子胶等方法来靶向新的 E3 连接酶。

连接体的长度及化学组成等特征与 PROTAC 的总体降解效率和选择性息息相关,具有合适长度范围连接体的 PROTAC 可以使三元复合物的空间构象更加稳定。然而,目前针对主体结构中间连接子的优化研究还不全面。随着计算机辅助设计和人工智能的兴起,可以通过建立智能的分子动力学模拟与预测模型和基于结构的筛选平台来预测三元复合物的最佳结构。此外,使用低温电子显微镜也是确定三元复合物结构的一种有效方法。通过基于结构的优化方法如设计并开发已知三元复合物的衍生物或异构体或许能使 PROTAC 具有不同的降解活性。另一方面,在进行连接子的设计时引入极性刚性基团可增加三元复合物的稳定性并且进一步优化 PROTAC 的药理学。尽管 PROTAC 在研究应用过程中的确面临着诸多挑战,但近年来,无论是生物学还是化学领域,众多令人惊讶并可观的研究结果表明,这些挑战并不是不可攻克的。相反,那些尚未被完

全解决的潜在问题吸引着学术界与工业界对其做出更有力的探究,这或许会给 TPD 领域带来前所未有的机遇。总而言之,PROTAC 的应用前景是巨大的。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] SUN XY, GAO HY, YANG YQ, *et al.* PROTACs: great opportunities for academia and industry[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 64.
- [2] PAIVA SL, CREWS CM. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 50: 111 – 119.
- [3] DALE B, CHENG M, PARK KS, *et al.* Advancing targeted protein degradation for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10): 638 – 654.
- [4] GADD MS, TESTA A, LUCAS X, *et al.* Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(5): 514 – 521.
- [5] DONOVAN KA, FERGUSON FM, BUSHMAN JW, *et al.* Mapping the degradable kinase provides a resource for expedited degrader development[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1714 – 1731. e10.
- [6] WENG GQ, SHEN C, CAO DS, *et al.* PROTAC-DB: an online database of PROTACs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1381 – D1387.
- [7] SAKAMOTO KM, KIM KB, VERMA R, *et al.* Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12): 1350 – 1358.
- [8] BYRD JC, HARRINGTON B, O'BRIEN S, *et al.* Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(4): 323 – 332.
- [9] WANG C, ZHANG YJ, YANG SB, *et al.* PROTACs for BRDs proteins in cancer therapy: a review[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37(1): 1694 – 1703.
- [10] LIU J, CHEN H, LIU Y, *et al.* Cancer selective target degradation by folate-caged PROTACs[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(19): 7380 – 7387.
- [11] SAKAMOTO KM, KIM KB, KUMAGAI A, *et al.* Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8554 – 8559.
- [12] SCHNEKLOTH JSJ, FONSECA FN, KOLDOBSKIY M, *et al.* Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12): 3748 – 3754.
- [13] LIAO HW, LI X, ZHAO LZ, *et al.* A PROTAC peptide induces durable  $\beta$ -catenin degradation and suppresses Wnt-dependent intestinal cancer[J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 35.
- [14] GHIDINI A, CLÉRY A, HALLOY F, *et al.* RNA-PROTACs: degraders of RNA-binding proteins[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(6): 3163 – 3169.
- [15] SAMARASINGHE KTG, JAIME-FIGUEROA S, BURGESS M, *et al.* Targeted degradation of transcription factors by TRAF-TACs: transcription Factor TArgeting Chimeras[J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(5): 648 – 661. e5.
- [16] SAMARASINGHE KTG, AN E, GENUTH MA, *et al.* OligoTRAF-TACs: a generalizable method for transcription factor degradation[J]. *RSC Chem Biol*, 2022, 3(9): 1144 – 1153.
- [17] KALRA P, DHIMAN A, CHO WC, *et al.* Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity[J]. *Front Mol Biosci*, 2018, 5: 41.
- [18] HE SP, GAO F, MA JH, *et al.* Aptamer-PROTAC conjugates (APCs) for tumor-specific targeting in breast cancer[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(43): 23299 – 23305.
- [19] PATIL KM, CHIN D, SEAH HL, *et al.* G4-PROTAC: targeted degradation of a G-quadruplex binding protein[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57(95): 12816 – 12819.
- [20] BANIK SM, PEDRAM K, WISNOVSKY S, *et al.* Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 291 – 297.
- [21] COTTON AD, NGUYEN DP, GRAMESPACHER JA, *et al.* Development of antibody-based PROTACs for the degradation of the cell-surface immune checkpoint protein PD-L1[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(2): 593 – 598.
- [22] BAMBERG E, GÄRTNER W, TRAUNER D. Introduction: optogenetics and photopharmacology[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(21): 10627 – 10628.
- [23] REYNDERS M, MATSUURA BS, BÉROUTI M, *et al.* PHOTACs enable optical control of protein degradation[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(8): eaay5064.
- [24] GAO J, HOU B, ZHU QW, *et al.* Engineered bioorthogonal POLY-PROTAC nanoparticles for tumour-specific protein degradation and precise cancer therapy[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4318.
- [25] ZHANG C, ZENG ZL, CUI D, *et al.* Semiconducting polymer nano-PROTACs for activatable photo-immunometabolic cancer therapy[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2934.
- [26] 谢妙红, 高明明, 凌佳楠, 等. 小分子蛋白降解靶向嵌合体的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(22): 2891 – 2899.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-04-01